

Identifikace stafylokoků použitím komerčních souprav STAPHYtest 24 a API Staph

Sedláček, I.¹, Petráš, P.², Plíšková-Pakrová, E.³, Škapová, T.⁴, Jančová, J.⁴, Ježek, P.⁵

¹Česká sbírka mikroorganismů (CCM), Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy Univerzity, Brno, Česká republika;

²Česká národní referenční laboratoř pro stafylokoky, Státní zdravotní ústav Praha, Česká republika;

³Laboratoř klinické mikrobiologie, IFCOR-99, Brno, Česká republika;

⁴Státní zdravotní ústav Ostrava, Česká republika;

⁵Laboratoř klinické mikrobiologie, okresní nemocnice Příbram, Česká republika

Abstrakt

Následující studie testovala identifikační účinnost dvou komerčních biochemických souprav určených pro identifikaci stafylokoků. Výsledky identifikace stafylokoků izolovaných z humánního klinického materiálu prokázaly, že STAPHYtest 24 je spolehlivá a účinná souprava, zatímco souprava API Staph vykazuje výsledky méně přesné. Tyto nepřesnosti jsou pravděpodobně způsobeny internetovým identifikačním programem *apiweb*.

Úvod

Stafylokoky představují značnou část povrchové mikroflóry savců a ptáků (kůže, kožní žlázy a sliznice) a některé druhy rodu *Staphylococcus*, hlavně *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, se často vyskytují jako etiologické agens při různých humánních i veterinárních infekcích. Identifikace stafylokoků založená na biotypizaci je stále běžně používaná v mnoha rutinních klinických laboratořích, přestože již existuje řada molekulárních metod pro rychlou diferenciaci a identifikaci kmenů. Účelem této studie bylo srovnání druhové identifikace stafylokoků za použití dvou komerčních souprav a jejich identifikační databáze.

Metody

V této srovnávací studii bylo vyhodnoceno dvěma komerčními identifikačními soupravami 40 referenčních stafylokokových kultur a 155 kmenů presumptivně stanovených stafylokoků izolovaných z humánního klinického materiálu. Referenční kmeny pochází z České sbírky mikroorganismů (CCM) (<http://www.sci.muni.cz/ccm>) a pro testování byly vybrány nejčastěji se vyskytující stafylokokové druhy a poddruhy (*S. aureus* subsp. *aureus*, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. hominis* subsp. *hominis* a subsp. *novobiosepticus*, *S. xylosus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. sciuri*, *S. lentus* a *S. capitis* subsp. *capitis* a subsp. *ureolyticus*). Humánní klinické izoláty stafylokoků pochází ze tří různých klinických mikrobiologických laboratoří v České republice a všechny představují nezávislé vzorky izolace a identifikace gram pozitivních kataláza pozitivních koků.

Referenční kultury i izoláty byly identifikovány soupravami STAPHYtest 24 (Pliva-Lachema Diagnostika) a API Staph (bioMérieux) bez použití dodatkových testů. Obě

soupravy byly použity doporučeným postupem podle instrukcí výrobce a odečítání testů bylo provedeno manuálně. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu TNW (STAPHYtest 24) nebo použitím internetového identifikačního programu *apiweb* (API Staph, <https://apiweb.biomerieux.com>). V případě sporných a ne zcela jasných výsledků byly použity doplňkové testy, které doporučuje výrobce. Individuální přístup k nejasným, problémovým či atypickým identifikacím nebyl na dané výsledky aplikován vzhledem ke snaze „standardnosti“ kritérií při porovnávání úspěšnosti identifikace jednotlivými soupravami. Všechny neidentifikované nebo rozdílně identifikované kmeny byly přetestovány v Národní referenční laboratoři pro stafylokoky.

Výsledky

Celkem 195 kmenů grampozitivních, kataláza pozitivních koků bylo identifikováno dvěma komerčními soupravami. 40 referenčních kmenů bylo poskytnuto CCM, 155 kmenů byly klinické izoláty získané ze tří různých laboratoří.

40 referenčních kmenů zastoupených 13 stafylokokovými druhy a poddruhy, které se nejčastěji vyskytují v klinickém materiálu, bylo spolehlivě identifikováno soupravou STAPHYtest 24. 5 kmenů bylo identifikováno zmíněnou soupravou pouze rodově a pro definitivní identifikaci byly nutné dodatkové testy. API Staph vyžadoval dodatkové testy v 19 případech ze 40 referenčních kultur a po použití doporučených dodatkových testů zůstaly 2 kmeny identifikovány špatně (*S. hominis* místo *S. xylosus*, CCM 4580 a *S. saprophyticus* místo *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* CCM 4747) a 3 kmeny neidentifikovány (CCM 3474, CCM 4748, CCM 4786), což značí 12,5 % chybovost *apiwebu*. Celkově, identifikace referenčních kultur byla úspěšnější než identifikace klinických izolátů, viz grafy, hlavně v případě soupravy STAPHYtest 24.

Klinické izoláty tvořily soubor běžně se vyskytujících stafylokokových druhů: *S. aureus* subsp. *aureus* (19 kmenů), *S. epidermidis* (26), *S. haemolyticus* (20), *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* (16), *S. hominis* subsp. *hominis* (15); nebo méně frekventované druhy *S. simulans* (9), *S. warneri* (7), *S. xylosus* (10), *S. sciuri* (5), *S. intermedius* (5), *S. lugdunensis* (4), *S. capitis* subsp. *capitis* (3), *S. capitis* subsp. *ureolyticus* (4) a *S. lentus* (3). Raritní identifikace (jeden kmen) byly *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, *S. auricularis*, *S. piscifermentans*, *S. arlettae*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* a *S. cohnii* subsp. *urealyticum*. Tři izoláty byly identifikovány pouze jako *Staphylococcus* sp., i přes použití široké škály testů.

Celkově, souprava STAPHYtest 24 úspěšně identifikovala 160 kmenů stafylokoků do druhu a poddruhu (82%), 27 kmenů bylo identifikováno jako *Staphylococcus* sp. (14%) a 8 kmenů zůstalo neidentifikováno nebo identifikováno chybně (4%). Použitím dodatkových testů doporučených programem TNW 6.5 se zvýšila druhová identifikace na 94%, 6 kmenů bylo identifikováno chybně (3%) a zbylých 6 kmenů zůstalo identifikováno pouze do rodu (3%). Při testování druhou komerční soupravou API Staph překvapivě bylo druhově identifikováno pouze 103 kultur (53%), 71 ze 195 studovaných bylo zařazeno pouze rodově (36%) a 21 kmenů (11%) nebylo identifikováno vůbec nebo bylo identifikováno chybně.

Výsledky prokázaly nedostatečnost soupravy API Staph pro spolehlivou identifikaci stafylokoků, pokud nejsou použity doplňkové testy. Použitím doplňkových testů doporučených internetovým programem *apiweb* se druhová identifikace zvedla na 84%. Neuvěřitelně však tento krok zvýšil procento chybných identifikací na 30 případů a tento počet ukazuje vážný problém buď soupravy API Staph nebo internetového programu *apiweb*.

Chybná identifikace obou souprav je zhrnutá v tabulce 1. Je zřejmé, že klinicky důležité druhy stafylokoků (např. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*) jsou oběma soupravami identifikovány správně. Biochemická identifikace stafylokoků byla problémová v případě *S. hominis* subspecies a u některých novobiocin rezistentních stafylokoků (např. *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, skupina *S. sciuri*). Problémovým testem u obou souprav se ukázala být fosfatáza.

STAPHYtest 24 má oproti API Staph několik výhod:

- bezčinnidlovost soupravy zvyšuje komfort i rychlost práce a zároveň eliminuje risk udělání technické chyby zakápnutím činidla do nesprávné jamky
- program TNW vykazoval vyšší uživatelský komfort než program *apiweb*, umožnil identifikaci některých poddruhů stafylokoků a jeho databáze obsahuje téměř všechny validně popsané stafylokoky (databáze *apiweb* není aktuální, neidentifikuje poddruhy následujících druhů stafylokoků: *S. hominis*, *S. capitis*, *S. saprophyticus* nebo *S. cohnii*)
- nedostatkem programu *apiweb* je, že některé doporučené doplňkové testy jsou těžko dosažitelné v běžné klinické laboratoři (např. turanóza). Oproti tomu TNW 6.5 doporučuje doplňkové testy běžně dostupné
- na druhou stranu, hlavní nevýhodou STAPHYtestu 24 je výskyt ne zcela jednoznačných výsledků v několika acidifikačních testech (cukry). Okyselování cukrů u soupravy API Staph je naprosto jasné a výsledky jsou dobře odlišitelné. Je zřejmé, že pH indikátor používaný v API Staph je vhodnější pro testování cukrů než ten, který je v soupravě STAPHYtest 24

Závěr

Naše výsledky ověřily užitečnost nové identifikační soupravy STAPHYtest 24 pro efektivní a spolehlivou identifikaci stafylokoků. STAPHYtest 24 má vyšší identifikační účinnost i uživatelský komfort.

Obě identifikační soupravy jsou vhodné pro druhovou identifikaci stafylokoků izolovaných z klinického materiálu a v případě STAPHYtestu 24 bez doplňkových testů.

Druhová identifikace při použití soupravy STAPHYtest 24 byla 82% a po použití dodatkových testů doporučených programem TNW 6.5 se zvýšila na 94%. Souprava API Staph byla méně úspěšná, získali jsme 53 % druhových identifikací a po použití dodatkových testů se úspěšnost identifikace zvýšila na 84%.

STAPHYtest 24 chybně identifikoval 6 kmenů, zatímco API Staph celých 30. Podle našeho mínění to není chyba soupravy, ale identifikačního programu *apiweb*.

Zřídka izolované druhy stafylokoků z nehumánního materiálu byly druhově identifikovány až po použití doplňkových testů; identifikace stafylokoků založená pouze na výsledcích ze soupravy je často nedostatečná.

Table 1. Chybné identifikace izolátů a referenčních kultur

Graph 2. Výsledky identifikace klinických izolátů

Graph 1. Výsledky identifikace referenčních kultur

Barcelona, Španělsko
19 - 22 Duben 2008